

ARTÍCULO

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA COVID-19. METABOLÓMICA EN TIEMPOS DE COVID

Ciclo de webinarios: Biorrefinerías en tiempos del COVID-19, conceptos y oportunidades para el desarrollo sostenible en Latinoamérica

Sesión I: Conociendo las herramientas para la obtención y caracterización de compuestos bioactivos y posibles antivirales a partir de subproductos agroalimentarios

27 de octubre de 2020

CENTRO DE FORMACIÓN DE LA COOPERACIÓN ESPAÑOLA EN LA ANTIGUA

El documento se realiza en el marco del «Ciclo de webinarios: Biorrefinerías en tiempos del COVID-19, conceptos y oportunidades para el desarrollo sostenible en Latinoamérica», organizado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), a través del Centro de Formación de la Cooperación Española en La Antigua (CFCE Antigua); el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); y el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), desarrollado el 27 de octubre de 2020.

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA COVID-19.

METABOLÓMICA EN TIEMPOS DE COVID

Alberto Valdés, Alejandro Cifuentes

Laboratorio de Alimentómica, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL, CSIC,
Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, España

email: a.valdes@csic.es



RESUMEN

La enfermedad por coronavirus 2019 (en inglés coronavirus disease, COVID-19) es una infección altamente transmisible y patógena causada por un virus que se ha denominado Coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio Agudo-2 (SARS-CoV-2), que surgió en Wuhan, China, en diciembre de 2019, y se extendió por todo el mundo. Aproximadamente el 80% de los pacientes infectados por SARS-CoV-2 muestran síntomas leves con buen pronóstico y se recuperan sin tratamiento médico. Sin embargo, alrededor del 20% de los pacientes padecen dificultad respiratoria y requieren intervenciones hospitalarias, incluida la ventilación mecánica, llegando en algunos casos a morir. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es fundamental la realización de un gran número de pruebas de detección de infección por SARS-CoV-2 para poder detectar a las personas infectadas, aislarlas, y así evitar la propagación del virus. Una de las principales cuestiones que se plantean en cuanto a la infección por SARS-CoV-2 es qué técnica diagnóstica

utilizar, en qué punto y hasta qué momento. Actualmente se recomienda el diagnóstico mediante pruebas moleculares (como la RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) que detecta el ARN del virus; o mediante la detección de anticuerpos a través de pruebas serológicas. Pero también se están desarrollando otros métodos fiables, rápidos y portátiles como el análisis de antígenos que permiten el diagnóstico masivo de la población para intentar contener la propagación del virus. El diagnóstico de la infección también se basa en la observación de los síntomas clínicos; y los últimos avances en estrategias analíticas, como en el campo de la metabolómica, han permitido la detección de cambios relacionados con la severidad de la enfermedad. Finalmente, otras aproximaciones como la Alimentómica podrían utilizarse para la búsqueda de compuestos provenientes de fuentes naturales con actividad antiviral y/o antiinflamatoria frente a la actual pandemia de SARS-CoV-2, o frente a otras enfermedades que puedan aparecer en el futuro.



1.- ¿QUÉ ES EL SARS-COV-2 O COVID-19?

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la gran familia Coronaviridae, que consta de dos subfamilias: Orthocoronavirinae y Torovirinae. La subfamilia Orthocoronavirinae se clasifica en cuatro géneros: α -coronavirus, β -coronavirus, γ -coronavirus y δ -coronavirus. Los α -coronavirus y β -coronavirus tienden a infectar mamíferos y causar infecciones respiratorias y gastrointestinales en humanos, como el coronavirus SARS (Síndrome Respiratorio Agudo, SARS-CoV), el coronavirus MERS (Síndrome Respiratorio de Oriente Medio, MERS-CoV) o la reciente enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19 o SARS-CoV-2). El SARS-Cov-2 posee ARN de sentido positivo monocatenario no segmentado (+ ARNsc), con un tamaño de 26000 a 32000 nucleótidos. Este ARN contiene seis marcos de lectura abiertos (ORF) y numerosos genes accesorios. Los primeros ORF (ORF1a/b), que abarcan los dos tercios del ARN viral, codifican dos proteínas grandes, la poliproteína 1a (PPIA) y la PPIAB. Estas poliproteínas se dividen en 16

proteínas no estructurales, responsables de la replicación y transcripción del ARN viral, y de otras proteínas. El resto de los ORF codifican las principales proteínas estructurales, incluidas las proteínas de la espiga (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N), todas ellas cruciales para la infectividad del SARS-CoV-2. El virus consiste de tres partes: el núcleo, donde se encuentran los genes; la envoltura, formada por ácidos grasos; y las espigas, que proporcionan la capacidad de adherirse y crear poros en las células que invaden. Los análisis del genoma han revelado que la secuencia del genoma del SARS-CoV-2 es 96% y 79,5% idéntica al coronavirus del murciélago denominado BatCoV RaTG13, y al SARS-CoV, respectivamente (V'kovski y cols., 2020). Por lo tanto, el murciélago se ha sugerido como un anfitrión de SARS-CoV-2 y la ruta de transmisión de SARS-CoV-2 podría ser a través de anfitriones intermedios aún desconocidos, entre los que se ha mencionado el pangolín.



2.- ¿CÓMO INFECTA EL CORONAVIRUS SARS-COV-2?

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN con apariencia de corona, con un diámetro de aproximadamente 60 a 140 nm. Se sabe que el virus entra en el organismo a través de la unión de una proteína de su superficie, la proteína S, con el receptor ACE2 (la enzima convertidora de angiotensina 2). El receptor ACE2 se encuentra principalmente en las células de la cavidad nasal, los pulmones y el intestino. Pero también se ha demostrado que el virus puede llegar al cerebro a través de otra proteína, la neuropilina-1 (NRP1) (Davies y cols., 2020). Una vez que las espigas del virus tocan una célula humana apropiada, el virus se adhiere a la célula y la cubierta membranosa del virus se fusiona con la membrana de la célula que está siendo

infectada. Esta fusión crea un poro por donde el virus introduce su cadena de ARN dentro de la célula. Una vez en el interior, el ARN del virus se procesa igual que si fuera del propio organismo, y se producen proteínas funcionales responsables de la replicación y la transcripción del virus. Por una parte, se producen ARNs que son traducidos en proteínas estructurales del virus y por otra se generan ARNs genómicos que serán empaquetados en los nuevos viriones que se van formando. Por último, cuando hay un gran número de nuevos virus dentro de la célula, el virus hace disolverse su envoltorio y se liberan al exterior de la célula pudiendo infectar otras células.



3.- ¿CÓMO RESPONDE NUESTRO ORGANISMO AL ATAQUE DE CUALQUIER VIRUS?

A partir de la infección por SARS-CoV-2, el sistema inmunitario de la persona infectada comienza a reaccionar de varias maneras y según la fase de la infección las respuestas son diferentes. Por un lado, se genera una respuesta inmune rápida a través del sistema del interferón (IFN), un sistema que permite bloquear la diseminación del virus, proteger los tejidos y promover el reclutamiento de células neutrófilas y linfocitos. Durante esta etapa de la infección hay diferentes respuestas celulares que tratan de combatir el virus: los macrófagos, o células que fagocitan al virus; y las células “natural killer” (NK), encargadas de eliminar las células infectadas. En una segunda fase de la infección se generan respuestas específicas contra el virus, como es la producción de anticuerpos frente al virus (a través de los linfocitos B), o la generación de linfocitos T, que identifican y destruyen las células infectadas con gran eficacia. Una vez que un paciente ha superado la infección, su sistema inmunitario

ha generado anticuerpos, proteínas capaces de proteger contra un posible nuevo ataque del virus, inmunizando al organismo contra la infección. Primeramente, se generan anticuerpos de tipo IgM, más rápidos pero menos potentes, y posteriormente anticuerpos de tipo IgG, más potentes y específicos frente a la infección. Lo anteriormente descrito es la respuesta estándar; si bien, en varios estudios se ha demostrado que algunos pacientes infectados por SARS-CoV-2 tienen una elevada concentración de moléculas citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, TNF), lo que se ha denominado ‘tormenta de citoquinas’ (Oliveira y cols., 2020; Mortaz y cols., 2020). La ‘tormenta de citoquinas’ produce una retroalimentación en la producción de defensas, lo que acaba colapsando el sistema inmunitario. El aumento de estas citoquinas es responsable de una inflamación no controlada en los pulmones que puede derivar en un empeoramiento de la enfermedad y llevar a la muerte del paciente.



4.- ¿CÓMO SE PUEDE DETECTAR UNA INFECCIÓN POR CORONAVIRUS?

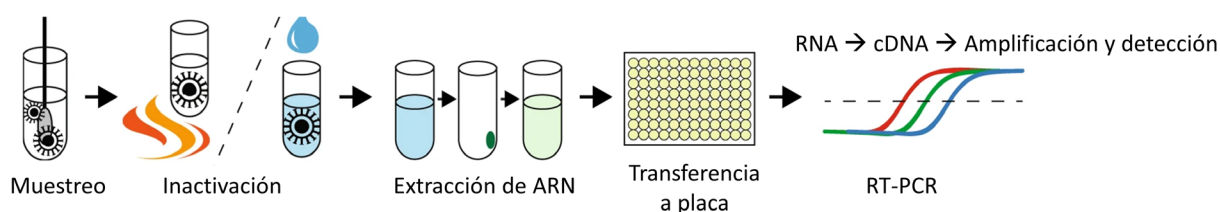
Teniendo en cuenta la estructura del virus, podemos distinguir tres formas diferentes de saber si una persona está infectada, detectando: i) la presencia de los genes del virus; ii) la cubierta del virus, incluidas las proteínas espiga; y iii) los anticuerpos producidos por nuestro organismo en la lucha contra el virus.

4.1 Detección de ARN viral por RT-PCR

La prueba más utilizada y fiable para el diagnóstico de SARS-CoV-2 es la prueba de RT-PCR. Esta prueba se realiza utilizando muestras de la cavidad oral o la nariz obtenidas mediante hisopos, pero también se están desarrollando métodos para detectar SARS-CoV-2 directamente en muestras de saliva. Existen distintas dianas génicas para la detección del virus, pero la mayoría se dirigen

a uno o más genes de la envoltura, de la nucleocápside (N), de la proteína S, del ARN de la polimerasa dependiente de ARN (RdRp) o del ORF1. La sensibilidad de la detección de todas estas dianas es similar, y el procedimiento esquematizado seguido se muestra en la Figura 1. Para la detección, los genes son primeramente extraídos del interior de los virus gracias al uso de productos químicos específicos que rompen la envuelta del virus sin afectar al ARN interior. Posteriormente se lleva a cabo la replicación de una secuencia única de estos genes para obtener suficiente cantidad para hacerlos detectables. Esta detección se realiza mediante el uso de “sondas” fluorescentes y el proceso de replicación requiere de temperaturas muy precisas, y dura entre 2 y 5 horas dependiendo de los reactivos utilizados. Finalmente, la intensidad de la fluorescencia es detectada y si la señal está por encima de un valor umbral se considera positiva la infección por coronavirus.

Figura 1. Descripción esquemática del procedimiento para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Reproducido con modificaciones de Smyrlaki y cols., 2020.



En la mayoría de las personas positivas para SARS-CoV-2, el ARN viral se vuelve detectable desde el día 1 de los síntomas y alcanza su punto máximo tras la primera semana del inicio de los síntomas. Esta positividad comienza a disminuir en la tercera semana y posteriormente se vuelve indetectable. Sin embargo, la positividad de la RT-PCR puede persistir más allá de tres semanas en pacientes graves. Un dato importante es que una prueba de RT-PCR "positiva" refleja solo la detección de ARN viral y no necesariamente indica la presencia de virus viables. En algunos casos, se ha detectado ARN viral después de más de seis semanas. También es importante tener en cuenta el tipo de muestras a investigar, ya que la positividad puede variar (Sethuraman y cols., 2020).

Las ventajas de la técnica de PCR son: i) está establecida y comercializada por multitud de compañías; ii) se adapta a nuevos virus de forma muy rápida, en días, dado el nivel tecnológico existente y la gran cantidad de diferentes reactivos ya existentes; iii) las sustancias requeridas se pueden producir en grandes cantidades; iv) son muy específicas; v) detecta cantidades muy pequeñas de virus (es muy sensible). Pero también tiene los siguientes inconvenientes: i) al ser tan sensible es muy vulnerable a la contaminación, por lo que el procesamiento de las muestras tiene que ser muy estricto para evitar falsos positivos; ii) requiere instrumentos complejos, precisos y caros, por

lo que deben centralizarse las muestras en laboratorios con personal especializado; iii) la obtención de los resultados puede tardar horas, además del tiempo de transporte de las muestras al laboratorio; iv) tiene un coste relativamente elevado (reactivos, gastos de personal, mantenimiento y coste de los equipos, transporte y manejo de las muestras, etc.).

4.2 Detección de antígenos de la cubierta del virus.

Este test es la prueba más rápida para detectar la infección por coronavirus y consiste en la detección del cambio de color que se produce en una serie de reactivos específicos cuando interaccionan las proteínas de la cubierta del virus (o antígenos) con anticuerpos específicos previamente inmovilizados en un soporte sólido (similar al utilizado en los test de embarazo). La obtención de la muestra es similar a la utilizada para llevar a cabo los test de RT-PCR, usando un hisopo. El análisis de la muestra consiste en depositar unas gotas de la muestra en la tira reactiva impregnada con ciertos reactivos específicos. Al cabo de unos minutos, esta tira de papel presentará unas zonas coloreadas dependiendo del resultado. El rendimiento clínico de este test depende en gran medida de las circunstancias en las que se utilizan y funciona mejor cuando la carga viral de la persona que se hace la prueba es alta.

Las ventajas de estos test son las siguientes: i) los ensayos son extremadamente rápidos y aportan resultados en solo 15 minutos; ii) permiten el muestreo no invasivo para detectar la presencia del virus. Las limitaciones de estos test son: i) la precisión y sensibilidad en el diagnóstico de coronavirus son limitadas y puede dar falsos negativos, por lo que en algunos casos son necesarias pruebas complementarias (como la RT-PCR) para verificar si un paciente está realmente infectado.

4.3 Detección de anticuerpos frente al SARS-CoV-2

La infección por SARS-CoV-2 también se puede detectar midiendo la respuesta inmune del paciente, además es una herramienta importante para saber el alcance de la infección por SARS-CoV-2 en la población e identificar a las personas inmunes y potencialmente protegidas de la infección, si bien se han dado algunos pocos casos de reinfección (Sethuraman y cols., 2020). Como se ha mencionado anteriormente, primero se generan anticuerpos de tipo IgM (si la infección está comenzando), y posteriormente anticuerpos de tipo IgG (si la infección ya pasó a una fase más aguda). A diferencia de la prueba de RT-PCR y de los test de antígenos, para la detección de IgM o IgG se utilizan muestras de plasma y su detección se puede llevar a cabo empleando dispositivos similares a los descritos para los antígenos (similares a los utilizados en los test de embarazo) o bien empleando una técnica inmunológica denominada ensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El procedimiento consiste en los siguientes puntos: 1) añadir una muestra de plasma del paciente a un pocillo que contiene el antígeno específico

de SARS-CoV-2; 2) los anticuerpos presentes (o no) contra el SARS-CoV-2 en el plasma del paciente se unen a los antígenos dispuestos en la base del pocillo y el resto de elementos presentes en la muestra del plasma es eliminado mediante lavados; 3) se añaden anticuerpos secundarios unidos con enzimas que se unen a los anticuerpos del paciente, el exceso no unido es eliminado mediante lavados; 4) se añade el sustrato que es reconocido por las enzimas que están unidas al anticuerpo secundario, en los pocillos donde se encuentran los anticuerpos contra SARS-CoV-2 empiezan a observarse cambios de color; 5) el producto formado es capaz de ser determinado con un lector de absorbancia; 6) si el paciente no fue infectado con COVID-19, no hay anclaje de anticuerpos de tal forma que no se observan cambios de color en el pocillo. Mediante el test ELISA se ha determinado que los niveles más altos de IgM e IgG ocurren en la segunda y tercera semana, pero pueden ser positivos a partir del cuarto día después del inicio de los síntomas.

Las ventajas de estos test son las siguientes: i) los ensayos son rápidos, aportan resultados en 5-15 minutos y tiene una especificidad superior al 95%; ii) la cantidad de muestra necesaria es muy pequeña y fácil de obtener; iii) tiene un coste bajo y su producción es masiva; iv) es una técnica muy establecida y se usa frecuentemente en la detección de otros virus; v) es portátil, se obtiene el resultado en el lugar de la muestra y no requiere de personal especializado. Pero esta técnica presenta las siguientes desventajas: i) los anticuerpos pueden tener reactividad cruzada con el SARS-CoV y posiblemente con otros coronavirus dando falsos positivos; ii) es necesaria una cantidad suficiente de anticuerpos en la muestra por lo que es difícil de detectar si se acaba de iniciar el contagio.

4.4 Test alternativos en desarrollo para la detección de SARS-CoV-2

Además de los test previamente explicados, la rápida propagación del SARS-CoV-2 y las directrices marcadas por la OMS han favorecido el desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas, portátiles, sensibles y baratas para el rastreo y aislamiento de las personas contagiadas. Entre estos métodos se encuentran los biosensores, que utilizan técnicas moleculares avanzadas como son CRISPR-Cas9, antígenos unidos a nanopartículas de oro y plata, aptámeros, o resonancia de plasmón superficial (Samson y cols., 2020). Además, otras técnicas como la tomografía computarizada de tórax, la nariz electrónica, o la espectroscopia de infrarrojo cercano se están adaptando para su aplicación en la detección de esta enfermedad, entre otras (Fan y cols., 2020; Taylor y cols., 2020).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballesteros-Vivas, B., Álvarez-Rivera, G., León, C. et al. Foodomics evaluation of the anti-proliferative potential of *Passiflora mollissima* seeds. *Food Res Int* 130 (2020a) 108938.
- Ballesteros-Vivas, B., Álvarez-Rivera, G., León, C. et al. Anti-proliferative bioactivity against HT-29 colon cancer cells of a withanolides-rich extract from golden berry (*Physalis peruviana* L.) calyx investigated by Foodomics. *J Func Food* 63 (2020b) 103567.
- Blasco, H., Bessy, C., Plantier, L. et al. The specific metabolome profiling of patients infected by SARS-CoV-2 supports the key role of tryptophan-nicotinamide pathway and cytosine metabolism. *Sci Rep* 10 (2020) 16824. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73966-5>.
- Bruzzone, C., Bizkarguenaga, M., Gil-Redondo, R. et al. SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *iScience* 23 (2020) 101645. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101645>.
- Davies, J., Randeva, H.S., Chatha, K. et al. Neuropilin-1 as a new potential SARS-CoV-2 infection mediator implicated in the neurologic features and central nervous system involvement of COVID-19. *Mol Med Rep* 22 (2020) 4221–4226. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11510>.
- Fang, Y., Zhang, H., Xie, J. et al. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology* 296 (2020) E115–E117. <https://doi.org/10.1148/radiol.20200432>.
- Mortaz, E., Tabarsi, P., Varahram, M. et al. The Immune Response and Immunopathology of COVID-19. *Front Immunol* 11 (2020) 2037. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02037>.
- Oliveira, D.S., Medeiros, N.I. & Gomes, J.A.S. Immune response in COVID-19: What do we currently know? *Microb Pathog* 148 (2020) 104484. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104484>.
- Poletto, P., Álvarez-Rivera, G., Torres, T.M.S. Compressed fluids and phytochemical profiling tools to obtain and characterize antiviral and anti-inflammatory compounds from natural sources. *Trends Analyt Chem* 129 (2020) 115942. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115942>.
- Samson, R., Navale, G.R. & Dharne, M.S. Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. *3 Biotech* 10 (2020) 385. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02369-0>.
- Sethuraman, N., Jeremiah, S.S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 323 (2020) 2249–2251. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>.
- Shen, B., Yi, X., Sun, Y. et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* 182 (2020) 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032>.
- Smyrlaki, I., Ekman, M., Lentini, A. et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun* 11 (2020) 4812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>.
- Taylor, W., Abbasi, Q.H., Dashtipour, K. et al. A Review of the State of the Art in Non-Contact-Sensing for COVID-19. *Sensors* 20 (2020) 5665. <https://doi.org/10.3390/s20195665>.
- Valdés, A., García-Cañas, V., Simó, C. et al. Comprehensive foodomics study on the mechanisms operating at various molecular levels in cancer cells in response to individual rosemary polyphenols. *Anal Chem* 86 (2014) 9807–9815. <https://doi.org/10.1021/ac502401j>.
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.



EMBAJADA
DE ESPAÑA
EN GUATEMALA



Cooperación
Española
CONOCIMIENTO/ LA ANTIGUA